中间锦鸡儿 *CCR2* 和 *CCR3* 基因的克隆和功能鉴定*

刘坤** 崔爽** 杨飞芸 韩晓东 王瑞刚 张子义***

（内蒙古农业大学生命科学学院　呼和浩特　010018）

摘要　肉桂酰辅酶 A 还原酶（cinnamoyl-CoA reductase, CCR）是催化木质素合成特异途径的第一个限速酶，对木质素的合成起关键作用。本文从中间锦鸡儿中克隆了两个 *CCR* 基因，*CiCCR2* 和 *CiCCR3*，其中 *CiCCR2* 基因开放阅读框为 897bp，编码 299 个氨基酸，*CiCCR3* 基因开放阅读框为 966bp，编码 322 个氨基酸。过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因拟南芥株系幼苗期和成熟期木质素含量均高于野生型，组织化学染色也表明转基因株系木质素积累较野生型拟南芥多，且转基因株系鲜重和干重显著高于野生型。

关键词　肉桂酰辅酶 A 还原酶　克隆　木质素　中间锦鸡儿

Clone and Functional Identification of Cinnamoyl CoA Reductase Genes from *Caragana intermedia*

LIU Kun　CUI Shuang　YANG Fei-yun　HAN Xiao-dong　WANG Rui-gang　ZHANG Zi-yi

（College of Life Sciences，Inner Mongolia Agricultural University，Hohhot, 010018，China）

Abstract Cinnamoyl-CoA reductase is the first rate limiting emzyme which catalyzes the biosynthesis of lignin and plays an important role in lignin biosynthesis. In the study, two cinnamoyl-CoA reductase encoding genes, *CiCCR2* and *CiCCR3,* were cloned from *Caragana intermedia* through PCR. The open reading frame(ORF) of *CiCCR2* is 897bp which encoding 299 amino acids, and ORF of *CiCCR3* is 966bp, which encoding 322 amino acids. Quantification assay and Histochemical staining showed that the lignin content increased by overexpressing of *CiCCR2* and *CiCCR3* in Arabidopsis compared with the wild type during both seedling and mature stages. At the same time, the fresh and dry weight of overexpressing plants were higher than that of the wild type.

Key words Cinnamoyl-CoA reductase　Clone　Lignin　*Caragana intermedia*

木质素（Lignin）是一种结构非常复杂的芳香杂聚物，是自然界中总量仅次于纤维素的天然有机高分子物质[1]。木质素主要分为 3 类，对-羟基苯基木质素(P-hydroxyphenyl lignin，H-木质素)，愈创木基木质素(Guaiacyl lignin，G-木质素)和紫丁香基木质素(Syringyl lignin，S-木质素)，分别由三种木质素单体组成，即香豆醇(P-coumaryl alcohol)、松柏醇(Coniferyl alcohol)及芥子醇(Sinapyl alcohol)[2]。木质素存在于维管植物次生细胞壁中，是在植物细胞壁次生加厚过程中形成的结构物质[3]。木质素具有重要的生理功能，不仅能够增加细胞壁韧性和硬度，还能确保水分、矿物质和有机物在植物体内的长距离运输[2]，从而有效地阻止各种植物病原物的侵入[4, 5]，此外还能够增强植物对生物与非生物胁迫的防御能力[6]。另外，木质素还可以作为一种新兴液体生物燃料的生产原料[7, 8]。

肉桂酰辅酶 A 还原酶（Cinnamoyl-CoA reductase，CCR）是催化木质素合成途径的第一个限速酶[9]，能够以对-香豆酰辅酶 A、阿魏酰辅酶 A 和 5-羟基-阿

*基金资助：国家自然科学基金（31360169）、内蒙古自治区科技创新团队（201503004）

**并列第一作者

***通讯作者，电子邮箱：E- mail：zzybiology@126.com

魏酰辅酶 A 为底物分别催化生成对-香豆醛、f, 松柏醛和 5-羟基-松柏醛[10]。CCR 对木质素合成途径的碳流具有潜在的调控作用，是调节碳素流向木质素重要的控制关节点。第一个 *CCR* 基因于 1972 年被 Mansell 从桉树中分离纯化得到[11]，此后又在拟南芥、水稻、蒺藜苜蓿等[12-14]植物中发现。根据不同的功能，CCR 可以分为 4 组：Group I 包含所有单子叶植物 CCR，而单子叶植物 CCR 又分为 a、b 两个亚组；Group II 为双子叶植物中具有功能的 CCR；Group III 包括裸子植物、蕨类、苔藓类 CCR；Group IV 是双子叶植物所有 CCR-like。

CCR 基因表达量的高低与木质素的含量有直接关系。在植物体中 *CCR* 基因的插入缺失能够导致植株发育及表型异常，例如矮小症、种子数量减少、茎细小以及木质素含量降低和木质部塌陷等[15]。1998 年，Piquemal 等[16]将烟草 *NtCCR* 基因的 cDNA 序列反义转入烟草中发现，转基因株系 CCR 活性明显下降且木质素含量减少到野生型的 50%，此外还引起植物叶片尺寸减小和形态异常等，还会引起木质部导管倒塌等。烟草 *NtCCR* 基因表达水平的降低不仅影响木质素的含量和细胞壁的合成，还影响其他代谢过程，如植物体脱毒过程、碳水化合物代谢、光合呼吸作用以及光氧化应激等[17]。杨树 *CCR* 基因表达量的下调不仅能够影响木质素含量以及木质化程度，还会导致半纤维素和果胶合成的减少[18]。拟南芥 *CCR* 基因缺失突变体 *irx4*（*irregular xylem 4*）也出现木质部倒塌现象，且木质素含量下降为野生型的 50%，此外还伴随有次生细胞壁的严重缺陷，进一步研究表明，突变体 *irx4* 减少木质素生物合成的同时，还影响植株的正常生长发育[19-21]。

中间锦鸡儿（*Caragana intermedia* Kuang et H.C.Fu）系豆科锦鸡儿属，多年生落叶灌木，主要分布于我国内蒙古、宁夏及陕西北部的干旱半干旱的荒漠地区[22]。锦鸡儿属植物具有抗寒、抗旱、耐盐碱、耐瘠薄等特点，对沙漠地区有很强的适应能力，保持水土、防风固沙，还有较高的饲用价值[23]。本研究从实验室[24]已经建立的干旱胁迫抑制消减杂交文库（SSH）中筛选得到 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 2 个基因，并对这两个基因的表达以及功能进行了初步的研究分析。

1　材料和方法

1.1　植物材料与试剂

中间锦鸡儿(*C. intermedia*)种子采自于内蒙古呼和浩特市和林县。拟南芥选用 Columbia-0 生态型。植物表达载体 pCanG-HA 由中国科学院遗传与发育生物研究所谢旗研究员惠赠。PCR 实验所用到的酶等试剂均购自宝日医生物技术有限公司。

1.2　方法

1.2.1 植物材料的处理

将籽粒饱满的中间锦鸡儿种子播种在土与蛭石（V:V=1:2）的钵子中，培养于 25℃、16 h 光照/8 h 黑暗的温室中。选取野外生长的同一株中间锦鸡儿的根、茎、叶、花和种子 5 个不同组织部位进行基因表达量检测，每个组织进行 3 次生物学重复。

1.2.2　中间锦鸡儿 DNA 的提取、总 RNA 提取及反转录

采用 CTAB 法提取中间锦鸡儿 DNA，操作按照 CTAB 法[25]提取步骤进行。

采用 TRizol 法[26]提取中间锦鸡儿总 RNA，用超微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量，选用电泳条带完整清晰且质量较好的 RNA 进行 cDNA 第一链合成。

1.2.3　中间锦鸡儿 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 全长克隆及表达载体构建

从 SSH 文库中获得 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因 EST 序列，通过 NCBI Blast 中

比对发现两个基因都有完整的 ORF。以中间锦鸡儿 cDNA 和 gDNA 为模板，以 F-CiCCR2-oe 和 R-CiCCR2-oe，F-CiCCR3-oe 和 R-CiCCR3-oe 为特异性引物，利用高保真酶 PrimeSTAR 进行 PCR 扩增。扩增条件：98℃预变性 3 min ，98℃变性 15 s，54℃退火 30 s（*CiCCR3* 的 Tm 值为 57℃），72℃延伸 1 min，72℃补充延伸 10 min，35 个循环。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，利用 DNA 回收试剂盒（天根生物公司）进行胶回收，产物连入平末端载体 pEASY-Blunt-Simple 并测序。用 Vector NTI 10.0（Invitrogen 公司）软件分析测序结果。将测序验证正确的序列通过相应的酶连入由 CaMV35S 驱动的植物表达载体 pCanG-HA 中，双酶切以及菌落 PCR 验证；将验证正确的重组质粒电转化农杆菌 GV3101，挑取阳性克隆，菌落 PCR 验证。引物合成和菌液测序均由生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

1.2.4 中间锦鸡儿 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因序列分析

利用 Blast（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）进行序列比对和分析，利用 NCBI 的 Splign（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign）在线分析序列的开放阅读框以及内含子，利用 ExPASy (http://www.expasy.org/proteomics)数据库中 ProtParam 在线工具预测蛋白质的分子质量、理论等电点以及氨基酸残基数等理化性质，利用 SOPMA 在线工具对蛋白质的二级结构进行预测，利用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对。利用 MEGA6.0 软件构建系统进化树。

1.2.5 中间锦鸡儿 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因不同组织表达分析

根据克隆得到的 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因的 cDNA 序列，使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 F-CiCCR2-q、R-CiCCR2-q 和 F-CiCCR3-q、R-CiCCR3-q（表 1）。使用 SYBR Green Premix II 荧光染料法，在 LightCycler480（Roche Diagnostics）实时荧光定量 PCR 仪上对中间锦鸡儿不同组织部位基因的转录水平表达进行分析。反应体系为 10 μL SYBR Premix Ex Taq，引物各 0.8 μL（10 μmol/L），cDNA 模板（稀释 16 倍）5 μL，灭菌水 3.4 μL，总体系 20 μL。反应程序为 95℃预变性 30 s，95℃变性 5 s，60℃退火 15 s，72℃延伸 30 s，40 个循环。中间锦鸡儿与拟南芥内参均选用 EF1α（表 1），实验结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

1.2.6 过表达拟南芥纯合体筛选

将含有 pCanG-CiCCR2-HA 和 pCanG-CiCCR3-HA 重组质粒的农杆菌侵染野生型拟南芥，收取种子，播种于筛选压为 25 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 培养基上，通过孟德尔遗传定律，筛选 T_3 代纯合体株系。以 T3 代转基因株系 cDNA 为模板，利用特异性引物 F-CiCCR2-q、R-CiCCR2-q 和 F-CiCCR3-q、R-CiCCR3-q 进行 RT-PCR 鉴定，通过实时荧光定量 PCR 检测目的基因在转基因株系中的表达量，选取 3 株表达水平较高的株系进行后续表型实验。

1.2.7 过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因拟南芥表型分析

1.2.7.1 干重、鲜重的测定

取生长 40d 大小的拟南芥野生型和转基因植株地上部分，称取其重量记为鲜重，之后放入培养皿中，置于 105℃烘箱中烘干 4-5h，取出称其重量，相隔十分钟重量不变，记为干重。每个株系 8 株幼苗，实验进行 3 次生物学重复。

1.2.7.2 木质素含量检测及木质素染色

木质素含量检测采用紫外分光光度法（溴乙酰法）。取生长 20 天大小（幼苗）和 40 天大小（成熟苗）的拟南芥野生型和转基因植株的莲座叶以上部分，充分研磨，加适量 95%的乙醇制成匀浆液后再用乙醇：己烷等体积溶液洗涤并收集

沉淀，室温自然干燥，适量25%的溴乙酰溶液溶解，70℃水浴30min，然后将反应液移入2mol/L的NaOH和冰乙酸混合液中，充分振荡，离心，取上清0.1ml，加3ml冰乙酸稀释，于280nm测定其吸光值，并计算木质素含量。每个株系12株幼苗，实验进行3次生物学重复。木质素染色采用Weisner染色法。取生长40d大小的拟南芥野生型和转基因植株的茎，将茎的横切面制作成组织切片约0.5~1mm，置于载玻片上，立即染色。加1%间苯三酚溶液（用92%乙醇配置）数滴，静置2min，再加数滴25%HCl溶液使其显色，2min后在显微镜下观察。

表1 本实验所用引物

Table1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′→3′)
F-CiCCR2-oe	GTCGAC(***Sal* I**)ATGGCACCTTCTTTCGACAT
R-CiCCR2-oe	GAGCTC(***Sac* I**)GAACAGCTAAGGTTATTGCCC
F-CiCCR3-oe	GTCGAC(***Sal* I**)ATGGCAACAAGTGGGGAAGG
R-CiCCR3-oe	ACTAGT(***Spe* I**)AACATTGGCAAGTCCAGTCTGTG
F-CiCCR2-q	CTGTCGCAAATTCAAGTTATGGC
R-CiCCR2-q	CAGCAGCTCCTCTCAAGTAAGGGT
F-CiCCR3-q	AAACACAGGCCACTGGAGGAA
R-CiCCR3-q	TGACATTTATTTTGAATCGAAGAGACC
qCiEF1αF	TGGGTGGGACATTCTCTGATT
qCiEF1αR	GCACGGTTCACTTCTTCTTAGC
qAtEF1αF	AGAAGGGTGCCAAATGATGAG
qAtEF1αR	GGAGGGAGAGAGAAAGTCACAGA

2 结果与分析

2.1 中间锦鸡儿 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因全长的克隆

从SSH文库中筛选得到 *CiCCR2*（登录号为MF969176）和 *CiCCR3*（登录号为MF969177），通过NCBI Blast中比对发现两个基因均含有完整的开放阅读框。用特异引物F-CiCCR2-oe和R-CiCCR2-oe，F-CiCCR3-oe和R-CiCCR3-oe扩增cDNA序列（图1a和1b），扩增产物连接到p*EASY*-Blunt-Simple克隆载体后测序验证。

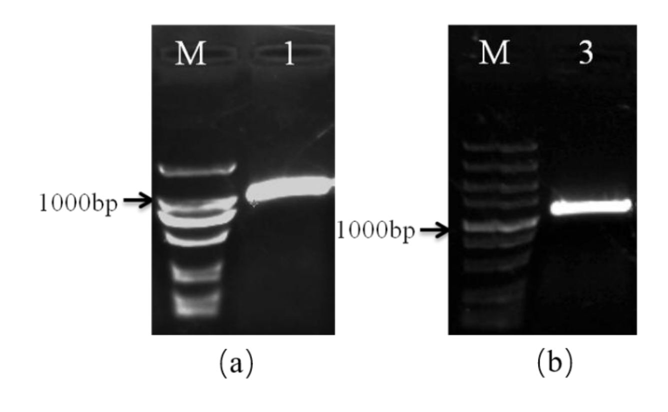


图1 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因cDNA扩增结果

M：Fermentas GeneRulerTM 1kb DNA Ladder

（a）*CiCCR2* cDNA；（b）*CiCCR3* cDNA；

Fig.1 Amplification results of cDNA of *CiCCR2* and *CiCCR3*

M: Fermentas GeneRuler TM 1kb DNA Ladder.

（a）*CiCCR2* cDNA；　（b）*CiCCR3* cDNA；

最终得到 *CiCCR2* 的 ORF 长 897 bp，可以编码 299 个氨基酸，*CiCCR3* 的 ORF 长 966 bp，可以编码 322 个氨基酸。

2. 2　*CiCCR2* 和 *CiCCR3* 序列分析

2. 2. 1　CiCCR2 和 CiCCR3 蛋白结构特性及理化性质分析

用 ExPASy 数据库中的 ProtParam 在线工具预测 CiCCR2 的蛋白分子量为 33.696kD，理论等电点为 5.11，蛋白平均疏水指数为（GRAVY）为-0.288。丝氨酸含量最多，为 9.4%，其次是亮氨酸 9.0%，天冬氨酸 8.4%。预测 CiCCR3 的蛋白分子量为 35.912 kD，理论等电点为 6.62，蛋白平均疏水指数（GRAVY）为-0.173。氨基酸含量最多的是亮氨酸 11.5%，其次是丝氨酸 9.6%和谷氨酸 9.0%。

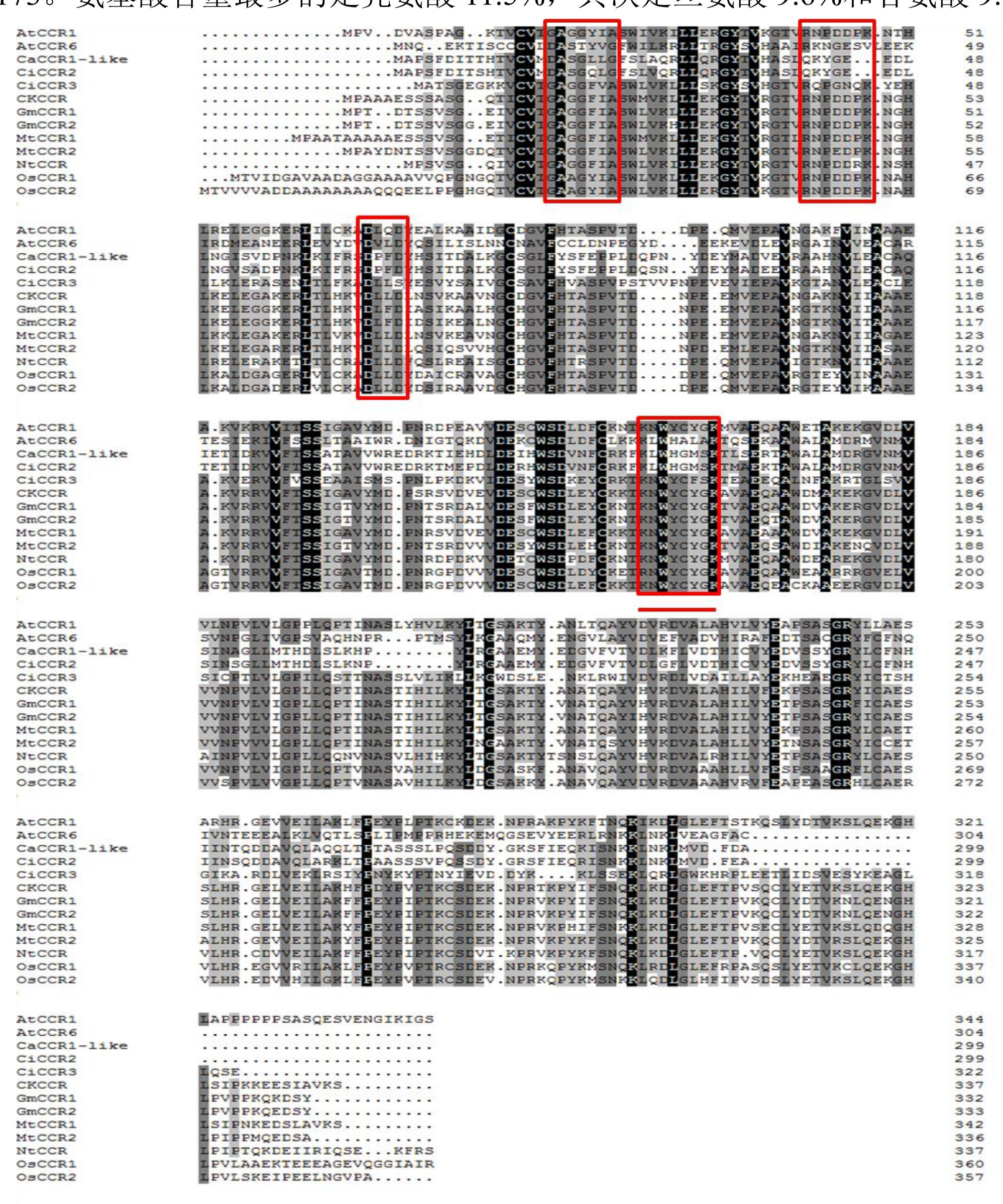


图 2　CiCCR2 和 CiCCR3 与其它物种 CCR 蛋白多重序列比对

框内区域为保守结构域，下划线表示酶催化位点区域

Fig.2 Multiple alignment of CiCCR2 and CiCCR3 along with other species CCR proteins

The box indicates the conserved domain; the underline indicates the catalytic site of CCR.

2.2.2　CiCCR2 和 CiCCR3 蛋白多重序列比对以及系统进化分析

将 CiCCR2 和 CiCCR3 蛋白序列与其他物种 CCR 蛋白序列进行比对，发现具有很高的相似性。CiCCR2 和 CiCCR3 具有典型的 NADP(H)结合结构域 $G(X)_2G(X)_2A$、$R(X)_5K$、$D(X)_2D$，以及底物结合位点和酶活性位点 KNWYCYGK（图 2）。其中 CiCCR3 具有与 NADP(H)结合的保守区域 $R(X)_5K$，而 CiCCR2 没有该保守区域。另外，CiCCR2 的 $G(X)_2G(X)_2A$ 片段发生了变化，为 $D(X)_2G(X)_2G$；CiCCR3 的 $D(X)_2D$ 片段也发生变化，为 $D(X)_2S$。此外，酶活性位点略有不同，CiCCR2 的酶活性位点为 KLWHGMSK，CiCCR3 的酶活性位点为 KNWYCFSK。

将CiCCR2和CiCCR3的氨基酸序列在NCBI中进行Blast比对，结果表明CiCCR2蛋白与鹰嘴豆（*Cicer arietinum*）CCR-like（XP_004512517.1）和蒺藜苜蓿CCR-like（XP_003612872.1）的相似性最高，均达到91%。CiCCR3蛋白与鹰嘴豆CCR-like isoform X1（XP_004515542.1）和蒺藜苜蓿CCR（XP_003604292.2）最为相似，相似性分别为87%和84%。已知的CCR分为Group I、II、III、IV，其中Group I又分为Group Ia和Group Ib。为进一步了解CiCCR2和CiCCR3与其它物种CCR蛋白的进化关系，将CiCCR2和CiCCR3蛋白序列与拟南芥、白菜（*Brassica rapa*）、西瓜（*Citrullus lanatus*）、大豆（*Glycine max*）、蒺藜苜蓿等双子叶植物，以及水稻、玉米等单子叶植物中相关CCR蛋白构建系统进化树（图 3）。从系统进化树可知CiCCR2和CiCCR3属于Group IV 组，目前对这两个蛋白的功能研究还比较少。

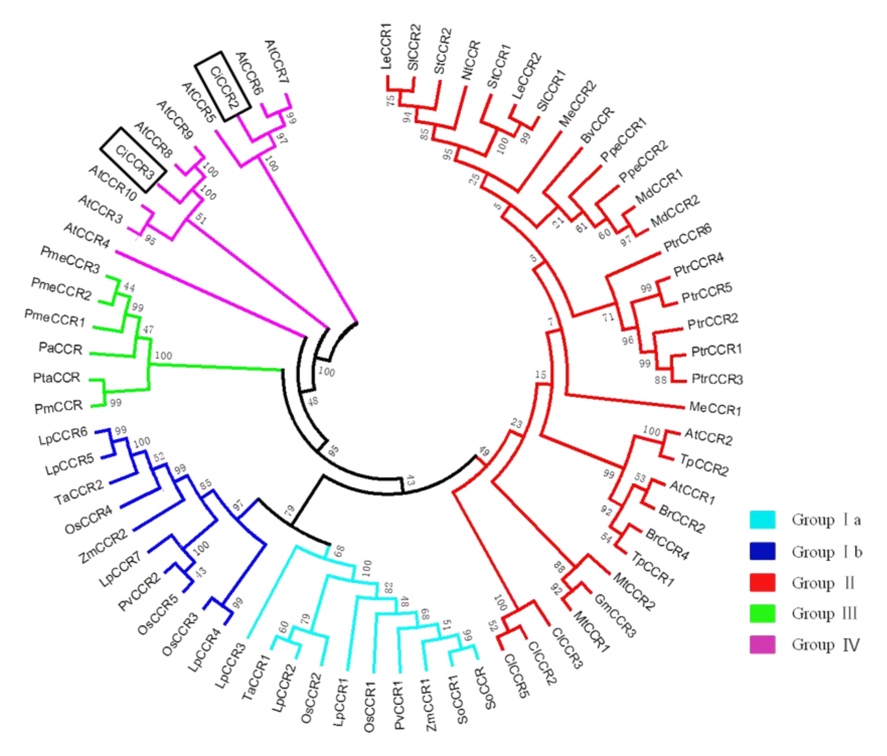


图 3　CiCCR2 和 CiCCR3 与其他物种 CCR 的系统进化分析

系统进化树用邻接法构建。Bootstrap 值设为 1000 次。

Fig.3 The phylogenetic analysis of CiCCR2 and CiCCR3 with other species CCRs

The phylogenetic tree is constructed by the neighbor-joining method. Bootstrap values based on 1,000 replications.

2.3　*CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因不同组织部位表达量检测

检测 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因在中间锦鸡儿中不同组织部位的表达量发现，两基因的表达模式有较大的差异性。在不同的组织部位中，*CiCCR3* 基因都比

CiCCR2 基因表达量高，其中 *CiCCR2* 基因在花和叶中的表达量最高，在根、茎、种子中相差不大，而 *CiCCR3* 基因在茎和种子中表达量最高，在叶、根中表达量较低。

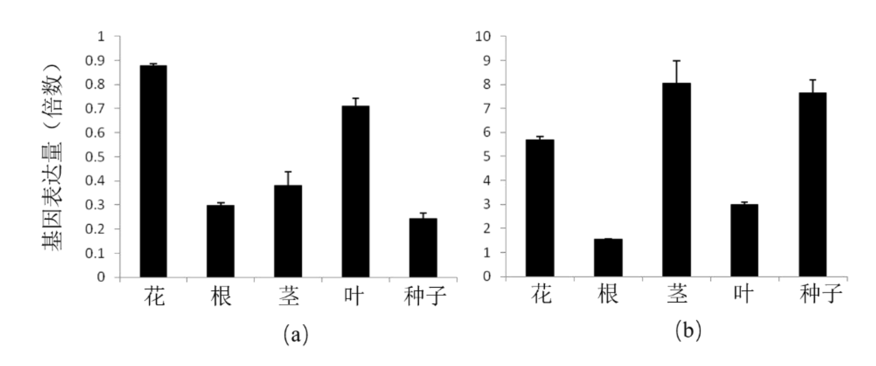


图 4　qRT-PCR 检测中间锦鸡儿 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 不同组织部位表达水平

（a）*CiCCR2*　（b）*CiCCR3*　内参基因选择 *CiEF1α*。实验结果用 $2^{-\Delta CT}$ 算法计算。

Fig.4 The expression level of *CiCCR2* and *CiCCR3* in *Caragana intermedia* assayed by real-time quantitative PCR

（a）*CiCCR2*　（b）*CiCCR3*　Reference gene was *CiEF1α*. The result was calculated by $2^{-\Delta CT}$

2.4　过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因拟南芥纯合体的获得

2.4.1　过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 表达载体构建与鉴定

为了研究 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 在植物体内的功能，构建了 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 过表达载体。将测序验证正确后的重组质粒用相应的限制性内切酶切下，并连接到 pCanG-HA 表达载体。将构建好的重组质粒 pCanG-*CiCCR2*-HA 和 pCanG-*CiCCR3*-HA 转化大肠杆菌感受态，重组质粒双酶切验证（图 5），能够切出目的条带，说明表达载体构建成功，之后将构建成功的表达载体电转化入农杆菌 GV3101 中。

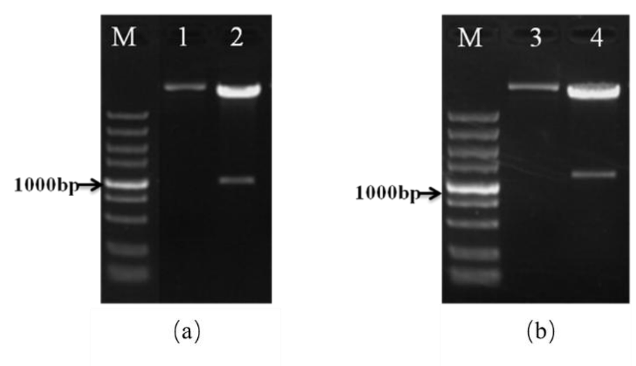


图 5　*CiCCR2* 和 *CiCCR3* 过表达载体双酶切鉴定

（a）*CiCCR2* 双酶切鉴定　M：TaKaRa DL5000 Marker　1.质粒对照　2.*Sal* I 和 *Sac* I 酶切鉴定

（b）*CiCCR3* 双酶切鉴定　M：TaKaRa DL5000 Marker　3.质粒对照　4.*Sal* I 和 *Spe* I 酶切鉴定

Fig.5 Identification by double digestion of *CiCCR2* and *CiCCR3* over-expression binary vector.

A．Identification by double digestion of *CiCCR2*　M：TaKaRa DL5000 Marker 1. Vector control 2. Digest with *Sal* I and *Sac* I

B．Identification by double digestion of *CiCCR3*　M：TaKaRa DL5000 Marker 3. Vector control 4. Digest with *Sal* I and *Spe* I

2.4.2　过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因纯合体的获得与鉴定

选取 T_3 代转基因纯合体拟南芥叶片，提取总 RNA 并反转录成 cDNA。以不同株系 cDNA 为模板，利用实时荧光定量 PCR 检测 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 在转基

因株系中的表达水平（图 6），并选择表达量较高的 CCR2-43、CCR2-9、CCR2-11 和 CCR3-8、CCR3-7、CCR3-22 等纯合体株系进行后续表型实验。

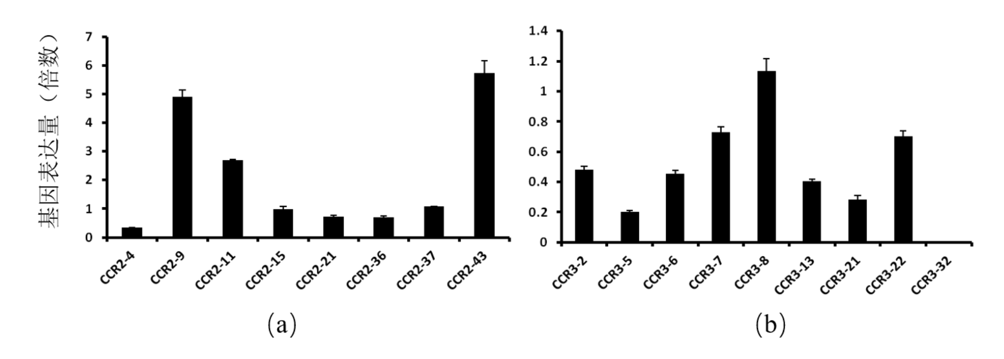


图 6 实时荧光定量 PCR 检测过表达株系 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 的表达水平

（a）*CiCCR2*（b）*CiCCR3* 内参基因选择 *AtEF1α*。实验结果用 $2^{-\Delta CT}$ 算法计算。

Fig.6 The expression level of *CiCCR2* and *CiCCR3* in transgenic lines assayed by real-time quantitative PCR

（a）*CiCCR2*（b）*CiCCR3* Reference gene was *AtEF1α*. The result was calculated by $2^{-\Delta CT}$.

2.5 过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因纯合体鲜重、干重测量

如图所示，相比野生型拟南芥，*CiCCR2* 和 *CiCCR3* 过表达株系干重和鲜重值均高，这表明过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 对植株的生长和发育方面产生了影响。其中 *CCR2-11* 株系和 *CCR3-8* 株系鲜重（图 7a 和 7c）高于其他两株系并且均高于野生型，干重（图 7b 和 7d）也具有相同的规律，且 *CCR3-8* 株系干重显著高于野生型，这些结果说明 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 过表达株系重量的增加是细胞的干物质。

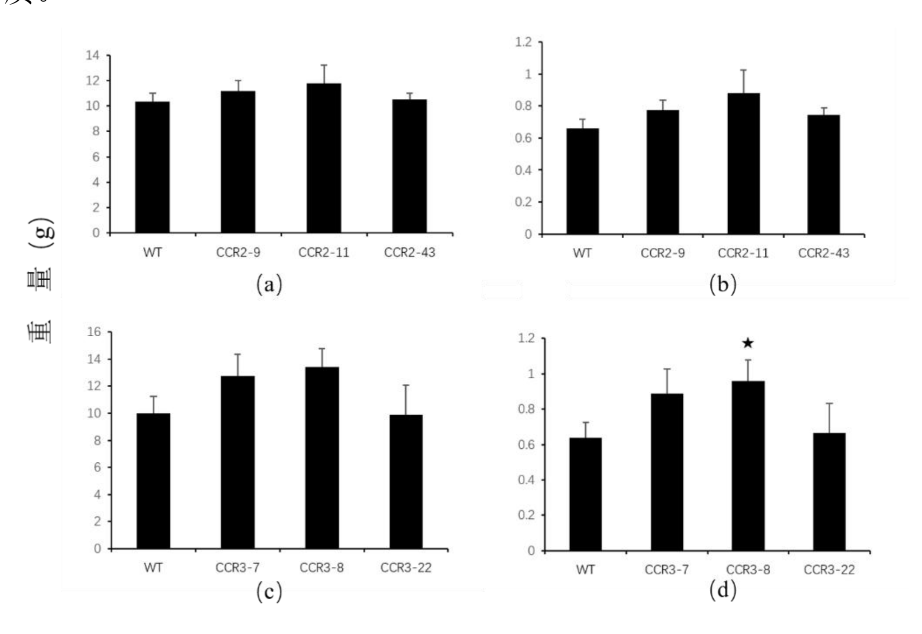


图 7 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因株系和野生型拟南芥重量

（a）和（c）为鲜重，（b）和（d）为干重

Fig.7 Weight of the *CiCCR2* and *CiCCR3* transgenic lines and wild-type *Arabidopsis thaliana*

（a）and（c）for fresh weight, （b）and（d）for dry weight.

2.6 过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因纯合体木质素含量的检测

植物 *CCR* 基因能够编码木质素合成途径上的关键酶，其表达量的高低影响着植物体内木质素的含量。本实验采用紫外分光光度法（溴乙酰法）检测不

同株系中木质素含量（图 8）。以木质素标准品测得木质素浓度与吸光值的回归方程为 Y = 25.45X + 0.0294，X 为木质素含量（mg/mL），Y 为吸光值，R^2= 0.9994。

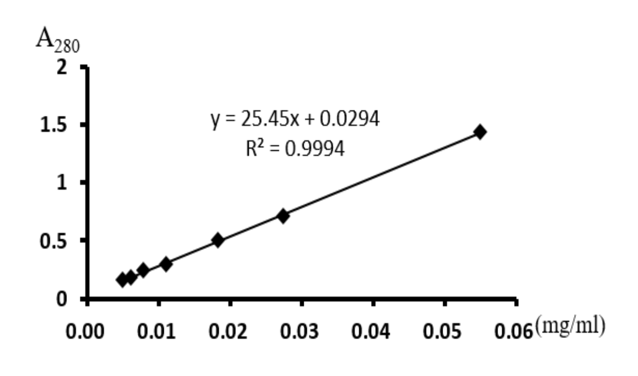


图 8　木质素含量标准曲线

Fig.8 Standard curve of lignin content

测定后发现在幼苗和成熟时期，*CiCCR2* 过表达株系中木质素的含量均高于野生型，但都不显著。而 *CiCCR3* 过表达株系在幼苗时期和成熟期木质素含量显著提高（图 9）。

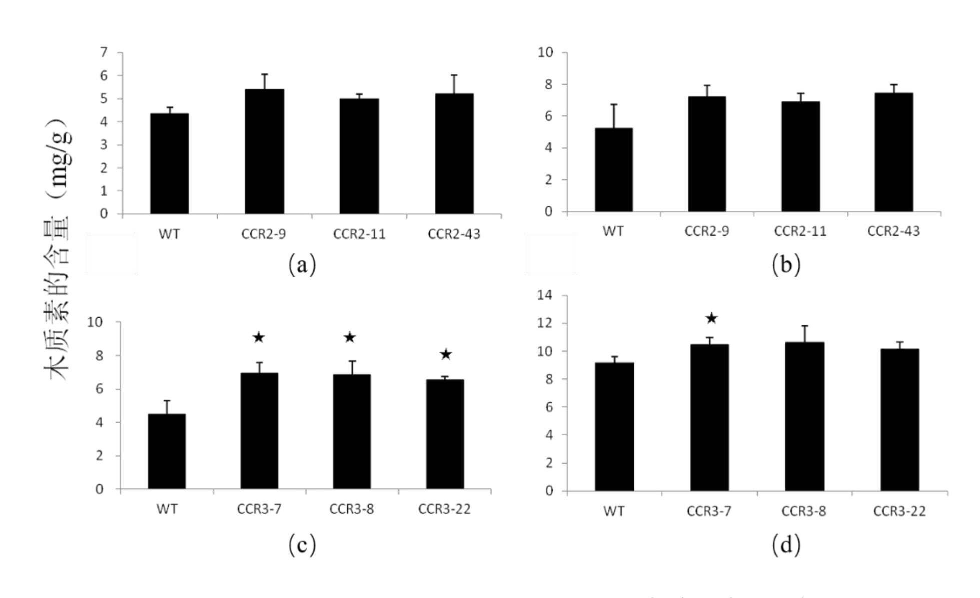


图 9　*CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因株系和野生型拟南芥木质素含量

（a）和（c）为幼苗，（b）和（d）为成熟时期。

Fig.9 Content of lignin in *CiCCR2* and *CiCCR3* transgenic lines and wild-type *A.thaliana*

（a）and（c）for young seedlings. （b）and（d）for mature seedlings.

2.7　过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 转基因纯合体木质素的染色

为了进一步验证 CiCCR2 和 CiCCR3 的功能，采用 Weisner 法对拟南芥茎的横切面进行组织化学染色，其中松柏醛和丁香醛会被染成红色，染色后呈色的面积可粗略反应木质素含量。染色后可以看出，转 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因的拟南芥木质素含量（红色部分）均比野生型拟南芥多（图 10 和图 11），说明在拟南芥中过量表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因能够增加植物体内木质素含量。

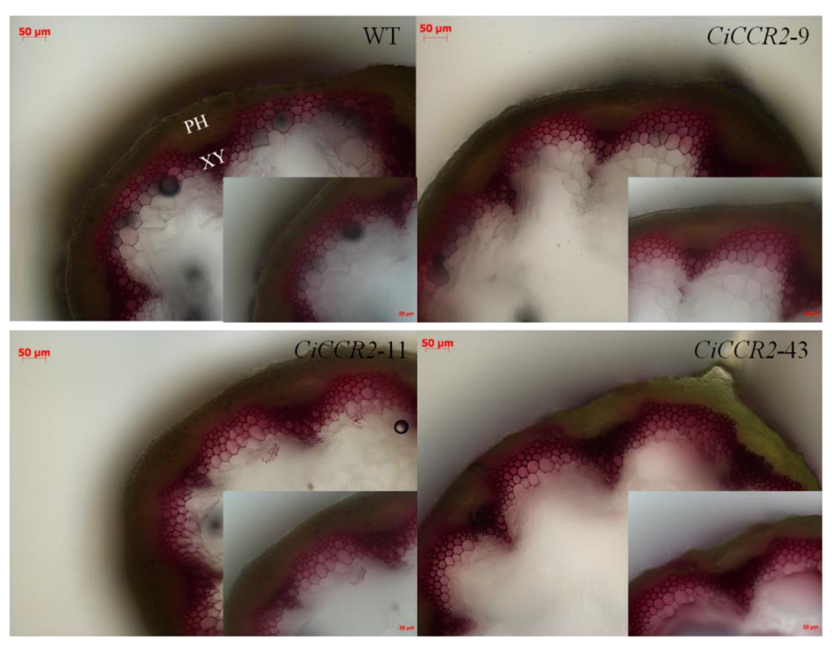


图 10　*CiCCR2* 转基因株系和野生型拟南芥组织化学染色

XY：木质部；　PH：韧皮部

Fig.10 Histochemical staining of the *CiCCR2* transgenic lines and wild-type *Arabidopsis thaliana*

XY: xylem; PH: phloem

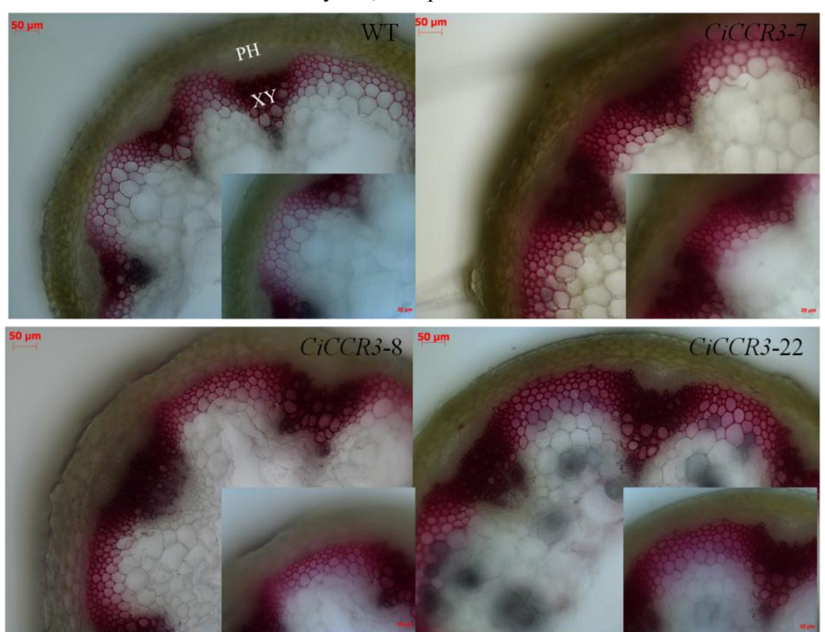


图 11　*CiCCR3* 转基因株系和野生型拟南芥组织化学染色

XY：木质部；　PH：韧皮部

Fig.11 Histochemical staining of the *CiCCR3* transgenic lines and wild-type *Arabidopsis thaliana*

XY: xylem; PH: phloem

3　讨论

3.1　基因序列分析

苯丙氨酸代谢途径产生大量的植物次生代谢产物，包括：黄酮、类黄酮、木质素等，这些次生代谢产物在维持植物正常生长、抵御病原菌、胁迫响应等过程中起到重要作用。植物木质素合成途径属于苯丙氨酸代谢的下游代谢路径，而肉桂酰辅酶 A 还原酶是木质素合成途径中的第一个关键酶。本实验克隆了中间锦

鸡儿 2 个 *CCR* 基因序列，通过 NCBI Blast 对比，*CiCCR2* 基因与同为豆科的鹰嘴豆和蒺藜苜蓿氨基酸序列相似性均达到 91%，*CiCCR3* 基因与这两个豆科植物相似性分别为 84%和 87%。另外多重序列比对结果表明两个基因均 63[具有典型的 NADP（H）结构域和底物催化活性位点。有研究报道植物体内保守氨基酸片段 $G(X)_2G(X)_2A$ 和 $D(X)_2D$ 参与 NAD（P）的结合[27, 28]。结果分析发现 CiCCR2 的 $G(X)_2G(X)_2A$ 片段发生了变化，为 $D(X)_2G(X)_2G$，CiCCR3 的 $D(X)_2D$ 片段也发生变化，为 $D(X)_2S$。此外，*CCR* 基因还有与 NADP（H）结合的其他保守氨基酸片段 $R(X)_5K$[29]，其中 CiCCR3 具有该氨基酸片段，而 CiCCR2 没有该片段。另外，大多数物种 CCR 蛋白都存在一段保守的酶活性位点，即 KNWYCYGK，例如拟南芥 AtCCR1 和 AtCCR2 以及番茄的 LeCCR1 和 LeCCR2 均含有 KNWYCYGK 保守性基序[30]，但是不同物种酶活性位点略有差别，例如苎麻 BnCCR1 和 BnCCR2 分别为 KLWYALGK 和 KSWYTLSK[31]，玉米 ZmCCR1 和 ZmCCR2 的是 RNWYCYGK 和 QNWYCYAK[32]。中间锦鸡儿 CiCCR2 酶活性位点为 KLWHGMSK，而 CiCCR3 为 KNWYCFSK。有研究表明，CCR 蛋白这段保守氨基酸序列 KNWYCYGK 可形成β-α-β二级结构，推断其为 CCR 的催化位点，同时辅助 NADP（H）的结合，尤其是首尾两个赖氨酸残基可能能够直接与底物相结合[33]。

3.2 组织表达模式分析

有研究报道 *CCR* 基因家族在不同种、属间，以及同一植物的不同组织部位的表达模式都是不同的，在不同组织部位中，*CiCCR3* 基因都比 *CiCCR2* 基因的表达量高，在拟南芥中就有类似的现象，例如拟南芥 *AtCCR1* 在所有组织中的表达水平都要比 *AtCCR2* 高[34]。此外板蓝根、银杏、挪威云杉 *CCR* 基因不仅在木质化的部位（例如茎）表达水平较高，在其他组织部位也有较高的表达量水平[35-37]。白杨 10 个 *CCR* 同源基因在树皮、叶以及木质部具有差异性表达，其中 *PoptrCCR1* 和 *PoptrCCR3* 在树皮中表达量最高，*PoptrCCR2* 在叶中的表达量最高，而 *PoptrCCR12* 和 *PoptrCCR14* 在木质部表达量最高[38]。本实验通过荧光定量 PCR 检测了 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 在中间锦鸡儿不同组织部位的表达水平，发现两基因的表达模式具有差异性，*CiCCR2* 基因在花中的表达量最高，其次为叶，根、茎、种子的表达量相差不大；*CiCCR3* 基因表达量最高的为茎和种子，表达量较低的为花、叶、根，这些结果表明同源 *CCR* 基因可能参与不同的细胞功能。

3.3 木质素含量分析

植物体内 *CCR* 以基因家族形式存在，同种植物 *CCR* 家族中，不同的 *CCR* 基因在植株生长发育中具有不同的生理功能。在很早之前，人们就开始研究木质素，以去除木质素为主要研究内容，但在研究过程中发现木质素的存在与植物的生长发育有关，并且木质素还在提高植物防御能力上起到一定的作用。有研究报道，拟南芥 *AtCCR1* 主要参与木质素的合成，*AtCCR1* 基因的沉默可降低木质素含量至野生型的 50%，同时伴有植株矮小、倒塌等现象[39]。同样在玉米 *zmccr1* 突变体中木质素的含量以及结构上也有类似的现象[40]。*TaCCR1* 基因的过表达能够增加小麦 H4564 品种木质素含量以及其机械强度[41]。*LlCCR* 基因过表达后植物出现生长发育旺盛、木质素含量明显增多[42]。过表达 *BpCCR1* 时，两个过表达株系木质素含量分别增加了 8.4%和 14.6%[43]。本实验在拟南芥中过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 基因，结果显示，在植物的不同生长阶段 *CiCCR3* 的过表达能够明显的提高木质素含量，由此推断 *CiCCR3* 可能参与调节中间锦鸡儿木质素特异合成途径，而 CiCCR2 是 CCR 的同工酶，在木质素合成上没有明显作用。

此外，本实验通过 Weisner 法对植物的木质部进行组织化学染色，结果显示，染色后的 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 过表达株系红色部分（即木质部）的面积要比野生型拟南芥的红色部分面积要大，说明过表达株系木质部细胞积累程度比野生型拟南芥要多。此外，*CiCCR2* 和 *CiCCR3* 过表达株系的干重和鲜重值均高于野生型拟南芥，表明过表达 *CiCCR2* 和 *CiCCR3* 对植株的生长和发育产生了显著的影响。

参考文献

[1] Ghosh R，Choi B，Cho B K，et al. Characterization of developmental- and stress-mediated expression of cinnamoyl-CoA reductase in kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*). The scientific world journal. 2014；2014：601845

[2] Boerjan W，Ralph J，Baucher M. LIGNIN BIOSYNTHESIS. Annual Review of Plant Biology. 2003，54（1)：519-546

[3] 李伟，熊谨，陈晓阳：木质素代谢的生理意义及其遗传控制研究进展. 西北植物学报 2003, **23**（4)：675-681

Li W，Xiong J，Chen X Y. Advances in the research of physiological significances and genetic regulation of lignin metabolism. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2003，23（4)：675-681

[4] Bhuiyan N H，Selvaraj G，Wei Y，et al. Role of lignification in plant defense. Plant Signaling & Behavior. 2009，**4**（2)：158

[5] Weng J K，Chapple C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. New Phytologist 2010，187（2)：273-285

[6] Zhong R，Morrison W H，Himmelsbach D S，et al. Essential Role of Caffeoyl Coenzyme A O-Methyltransferase in Lignin Biosynthesis in Woody Poplar Plants. Plant Physiology，2000，124（2)：563-578

[7] Ragauskas A J，Beckham G T，Biddy M J，et al. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. Science，2014，344（6185)：1246843.

[8] Tang W，Tang A Y. Transgenic woody plants for biofuel. Journal of Forestry Research，2014，(2)：225-236

[9] Van D J. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. Plant Journal for Cell & Molecular Biology，1997，11（3)：429-441

[10] Weia L I，Tan X F，Chen H P. Structure,Function and Application Potential of Cinnamoyl-CoA Reductase(CCR) Gene in Plant. Nonwood Forest Research，2009

[11] Mansell R L，Stöckigt J，Zenk M H. Reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol in a cell free system from a higher plant. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie，1972，68（3)：286–288

[12] Kawasaki T，Koita H，Nakatsubo T，et al. Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2006，103（1)：230-235

[13] Lauvergeat V，Lacomme C，Lacombe E，et al. Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from Arabidopsis thaliana are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. Phytochemistry，2001，57（7)：1187-1195

[14] Zhou R，Jackson L，Shadle G，et al. Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in Medicago truncatula. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2010，107（41)：17803-17808

[15] Mir Derikvand M，Sierra J B，Ruel K，et al. Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl

malate in Arabidopsis mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1. Planta，2008，227（5）：943-956

[16] Piquemal J，Lapierre C，Myton K，et al. Down-regulation of Cinnamoyl-CoA Reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. Plant Journal，1998， 13（1）：71–83

[17] Dauwe R，Morreel K，Goeminne G，et al. Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. Plant Journal，2007，52（2）：263–285

[18] Leplé J C，Dauwe R，Morreel K，et al. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. The Plant Cell，2007，19（11）：3669-3691

[19] Jones L，Ennos A R，Turner S R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. The Plant journal: for cell and molecular biology，2001，26（2）：205-216

[20] Laskar D D，Jourdes M，Patten A M，et al. The Arabidopsis cinnamoyl CoA reductase irx4 mutant has a delayed but coherent (normal) program of lignification. The Plant journal : for cell and molecular biology，2006，48（5）：674-686

[21] Patten A M，Cardenas C L，Cochrane F C，et al. Reassessment of effects on lignification and vascular development in the irx4 Arabidopsis mutant. Phytochemistry，2005，66（17）：2092-2107

[22] Han X，Feng Z，Xing D，et al. Two NAC transcription factors from Caragana intermedia altered salt tolerance of the transgenic Arabidopsis. BMC plant biology，2015，15：208.

[23] 路静，杨万政，王捷，等. 蒙药锦鸡儿的研究进展. 中国民族医药杂志，2010，16（4）：56-59

Lu J，Yang W Z，Wang J，et al. The Progress of chemistry and Pharmacology of Caragana. Journal of Medicine & Pharmacy of Chinese Minorities，2010，16（4）：56-59

[24] 杨杞，张涛，王颖，等. 干旱胁迫下柠条锦鸡儿叶片 SSH 文库构建及 CkWRKY1 基因克隆. 林业科学，2013（7）：62-68

Yang Q，Zhang T，Wang Y，et al. Construction of a Suppression Subtractive Hybridization Library of Caragana korshinskii Under Drought Stress and Cloning of *CkWRKY1* Gene. Scientia Silvae Sinicae，2013（7）：62-68

[25] 韩晓敏. 中间锦鸡儿 3 个非生物胁迫相关转录因子的克隆与功能分析. 呼和浩特：内蒙古农业大学，生命科学学院，博士，2015

Han X M. The Cloning and Analysis of Three Stress-related Transcription Factors from *Caragana intermedia*，Hohhot：Inner Mongolia Agriculture University，College of Life Sciences，Ph.D 2015

[26] 魏丽丽. 过表达柠条锦鸡儿 CkDREB1 基因的拟南芥抗旱和抗冷的机理分析. 呼和浩特：内蒙古农业大学，生命科学学院，硕士，2013

Wei L L. Mechanism Analysis of Cold and Drought Tolerance of The Transgenic Arabidopsis Overexpressing DREB1 from Caragana Korshinskii Kom. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University，College of Life Sciences，Ph.D，2015

[27] Carugo O，Argos P. NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. Proteins-structure Function & Bioinformatics，1997，28（1）：10-28

[28] Filling C，Berndt K D，Benach J，et al. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. Journal of Biological Chemistry，2002，277（28）：25677-25684

[29] Pan H, Zhou R, Louie G V，et al. Structural studies of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase, key enzymes of monolignol biosynthesis. Plant Cell，2014，26（9）：3709-3727

[30] 刘晓晶，崔浪军，夏飞，等. 拟南芥肉桂酰辅酶 A 还原酶(AtCCR1/2)基因的生物信息学分析. 陕西师范大学学报(自然科学版)，2011（3）：67-72

Liu X J, Cui L J, Xia F, et al. Bioinformatic analysis of Cinnamoyl CoA reductase(AtCCR1/2)gene from Arabidopsis thaliana. Journal of Shaanxi Normal University Natural Science Edition，2011（3）：67-72

[31] 唐映红. 苎麻木质素合成关键酶 4CL 和 CCR 基因 cDNA 序列的克隆与表达分析. 长沙：湖南农业大学，硕士，2015

Tang Y H. The cDNA cloning and expression analysis of key enzyme 4CL and CCR gene in ligninsynthesis pathway of Boehmeria nivea. Chang sha: Hunan Agricultural university，Master，2015

[32] Pichon M，Courbou I，Beckert M，et al. Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. Plant molecular biology，1998，38（4）：671-676

[33] Lacombe E，Hawkins S，Van Doorsselaere J，et al. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. The Plant journal : for cell and molecular biology，1997，11（3）：429-441

[34] Raes J，Rohde A，Christensen J H，et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. Plant Physiology，2003，133（8）：1051

[35] Hu Y，Di P，Chen J，et al. Isolation and characterization of a gene encoding cinnamoyl-CoA reductase from Isatis indigotica Fort. Molecular Biology Reports，2011，38（3）：2075-2083

[36] Cheng H, Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene in Ginkgo biloba: Effects on lignification and environmental stresses. African Journal of Biotechnology，2012， 11（26）：6780-6794

[37] Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, et al. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. Plant Molecular Biology， 2007，65（3）：311-328

[38] Barakat A，Yassin N B，Park J S，et al. Comparative and phylogenomic analyses of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamoyl-CoA-reductase-like gene family in land plants. Plant Science， 2011, 181（3）：249-257

[39] Goujon T，Ferret V，Mila I，et al. Down-regulation of the AtCCR1 gene in Arabidopsis thaliana: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. Planta，2003，217（2）：218-228

[40] Tamasloukht B，Lam W，Martinez Y，et al. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. Journal of experimental botany，2011，62（11）：3837-3848

[41] Ma Q H. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. Journal of Experimental Botany，2007，58（8）：2011

[42] Prashant S，Sunita M S，Pramod S，et al. Down-regulation of Leucaena leucocephala cinnamoyl CoA reductase (LlCCR) gene induces significant changes in phenotype, soluble phenolic pools and lignin in transgenic tobacco. Plant Cell Reports，2011，30（12）：2215-2231

[43] Zhang W, Wei R, Chen S, et al. Functional characterization of CCR in birch (Betula platyphylla × Betula pendula) through overexpression and suppression analysis. Physiologia Plantarum， 2014，154（2）：283